ポジティブリスト農薬メソッド用の高速 GC/MS ソリューション

アプリケーション

Philip L. Wylie

厚生労働省は 2006 年、農薬、飼料添加物、動物用医薬品の規制に関する新たな制度を導入しました。この「ポジティブリスト制度」は、認可リストに記載された化合物のみを食品生産に使用できるものとし、そうした化合物の規制に関する枠組みを提供するものです。この新たな規制により、幅広い種類の食品に残留する規制対象化合物を検出できる分析メソッドの必要性が高まっています。規制対象となる化合物の大部分は農薬です。多くの場合、残留農薬の測定には、質量分析を組み合わせたガスクロマトグラフまたは液体クロマトグラフ(GC/MS または LC/MS)が用いられます。日本市場の食品サンプルの迅速かつ総合的な分析を求める声に応えるために、アジレントはデコンボリューションレポート作成ソフトウェア（DRS）使用した新しい日本ポジティブリスト農薬データベースを発表しました。この新しいデータベースと DRS を使えば、GC/MS データファイルをスクリーニングし、GC で分析可能な日本政府が規制している 430 種類の農薬を検出することができます。プロセスは完全に自動化されており、1 サンプルあたり 2 分ほどで完了します。

食品抽出物の残留農薬分析では、きわめて汚れたサンプルを分析することになります。これは、入念なクリーンアップ手順を要するため除去したい化合物とともに目的の農薬が除去されるおそれがあります。そのため、多くのマトリクスを含むサンプル中で、微量の農薬を検出しなくてはならないという困難が生じます。DRS を使えば、マトリクスを「透視」し、分析対象化合物（この場合は農薬）を同定することが可能になります。DRS の核となっているのは、Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System(自動マススペクトルデコンボリューション同定システム：AMDIS) と呼ばれる米国標準技術局 (NIST) のソフトウェアです。AMDIS は、バックグラウンドノイズのプロファイリング、スペクトルの歪み補正、複数スキャンの補間により、スペクトル内のすべてのイオンについて、より正確なリテンションタイムを決定します。その後、同じリテンションタイムを持つ、同様にクロマトで上下動するイオンを探します。これらのイオンをグループ化して「コンポーネント」スペクトルを作成します。このスペクトルは、日本ポジティブリスト農薬ライブラリに照らして検索されます。基本的に、AMDIS はライブラリ検索が可能なクリーンなスペクトルをバックグラウンドから抽出します。

デコンボリューションのパワーを示すために、229 種類の農薬を添加したピーマンエキスを分析しました。 229 種類のうち、約 148 種類が GC/MS による分析が可能です。このエキスのトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示しています。図 2 には、デコンボリューションされていない 17.840 分時点のスペクトル (上) と、デコンボリューションされたスペクトル（中）を示しています。デコンボリューションされたスペクトルは、フェンヘキサミドのライブラリスペクトル（下）と良好に一致しています。

概要

- デコンボリューションにより、ライブラリ検索が可能なクリーンなスペクトルを未分離ピークから抽出できます。
- アジレントのポジティブリスト農薬データベースとデコンボリューションレポート作成ソフトウェア(DRS) を使えば、日本政府が規制する 430 種類の農薬に対して GC/MS データを 1 回の分析でスクリーニングすることができます。
- リテンションタイムロッキングにより、ほぼすべての偽陽性ヒットを排除できます。
- プロセスは完全に自動化されており、1 サンプルあたり 2～3 分で完了します。信頼性も従来の GC/MS メソッドより高くなっています。
- DRS サマリーレポートでは、デコンボリューションされていないスペクトルとデコンボリューションされたスペクトルをもとに、較正した化合物を定量します。

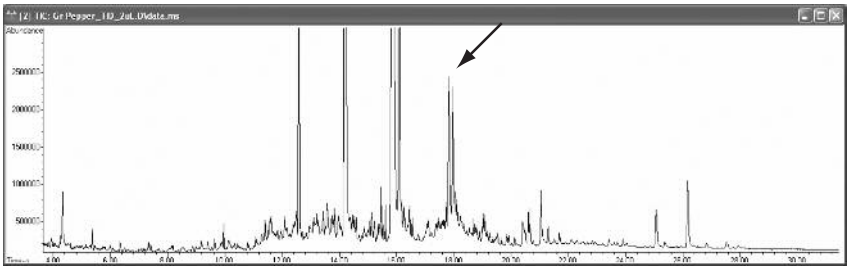

図 1.　229 種類の農薬を各 100 ppb で添加したピーマンエキスの GC/MS トータルイオンクロマトグラム（スキャンモード）。矢印は農薬フェンヘキサミドの溶出を示しています。フェンヘキサミドのピークは、それよりも大きい未分離ピークに埋もれています。

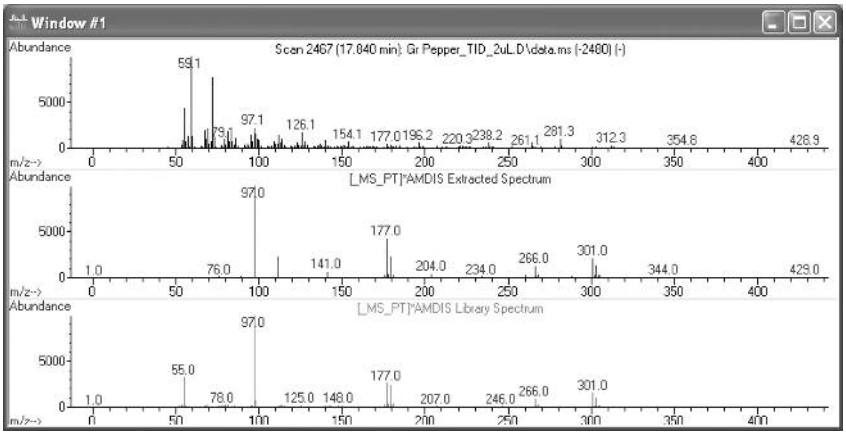

図 2.　上：図 1 で示したピーマンエキスのデコンボリューションされていない 17.840 分のスペクトル
中：デコンボリューションされた 17.840 分のスペクトル
下：日本ポジティブリスト農薬ライブラリのフェンヘキサミドスペクトル

図 3 に、農薬添加ピーマンエキスの DRS レポートの一部を示しています。表のフォーマットと提供される情報をわかりやすく示すために、表の大部分を省略しています。

最初の 3 列には、リテンションタイム、CAS 番号、DRS ソフトウェアで検出された分析対象化合物の名前が記載されています。次の 2 列は、Agilent GC/MS ChemStation により算出された定量値を示しています。最初の値（4 列目）は、デコンボリューションされていない目的イオンにより算出されたもので、標準的な GC/MS メソッドで得られる典型的な結果を示しています。「AMDIS」とある列の値は、デコンボリューションされた目的イオンから算出されたものです。

図 3 の定量結果は、較正テーブル中の全農薬に適用された平均レスポンスファクタをもとに算出された概算値にすぎないという点に留意してください。化合物は個別に較正されていません。多くのラボでは、目的農薬リストについて多点検量線を適用し、その他の化合物については平均の較正係数を用いています。

MSD デコンボリューションレポート

サンプル名： ピーマン
データファイル： TID & Japanese method\Gr Pepper_TID_2uL.D を用いた C:\MSData\Sept 04_07 Lehotay サンプル
日付/時間： 2008 年 7 月 14 日 (月) 1:59:58 PM

近接ピーク減算 = 2
分解能 = 高い
感度 = 非常に高い
形状要件 = 低い

AMDIS ターゲットライブラリで検出された成分について、NIST ライブラリを用いて検索しました。

			量 (ng/uL)		AMDIS		NIST	
R.T.	CAS #	Compound name	Chem-Station	AMDIS	Match	R.T. diff sec.	Reverse match	Hit num.
6.4699	10265926	メタミドフォス	0.19	0.17	82	2.4	88	1
6.6154	62737	ジクロルボス	0.13	0.10	84	1.2	86	1
7.2062	1563388	カルボフラン-7-フェノール	0.07	0.05	88	1.0	80	1
15.397	32809168	プロシミドン	0.28	0.22	87	–0.5	83	1
15.407	148798	チアベンダゾール	0.46	0.37	67	–1.5	66	1
18.217	51036	ピペロニルブトキシド	1.02	0.15	97	–0.6	90	1
18.354	106325080	エポキシコナゾール	0.35	0.16	86	–0.3	–	–
18.355	52669928	1-ブタノン, 4-[4-（4-クロロフェニル）-1,2,3,6-テトラヒドロ-1-ピリジル]-1-（4-フルオロフェニル）-	–	–	–	–	59	1
18.532	36734197	イプロジオン	0.04	0.07	44	–0.5	58	11
18.539	119120	ピリダフェンチオン	0.25	0.20	82	–0.2	66	1
18.573	135410207	アセタミプリド	0.05	0.03	46	–0.1	52	1
18.696	82657043	ビフェントリン	1.39	1.06	96	–0.7	90	1
20.674	96489713	ピリダベン	1.04	0.84	92	–0.7	90	1
20.682	67747095	プロクロラズ	0.10	0.04	69	–0.8	60	1
24.042	110488705	ジメトモルフ-（E）	0.16	0.15	88	–1.4	86	1
12.578		フェナントレン-d10	10.00	–	–	–	–	–

図 3. 229 種類の農薬を各 100 ppb で添加したピーマンエキスの DRS レポートの一部。一部の農薬は GC で検出できません。229 種類の農薬のうち、156 種類がこの GC/MS メソッドで検出されました。ここでは、レポートの一部のみを示しています。列 4 と列 5 の定量結果は、平均レスポンスファクタをもとに算出した概算値です。各化合物の個々の較正はしていません。

「AMDIS/Match」の列は、デコンボリューションされたスペクトルとポジティブリスト農薬ライブラリスペクトルのマッチ率を示しています。スペクトルマッチの許容範囲は、ユーザーによる設定が可能です。許容範囲を下回るマッチ率はレポートされません。

ポジティブリスト農薬データベースには、公表されている日本ポジティブリストメソッドで使用される各農薬のリテンションタイムが含まれています。リテンションタイムロッキング（RTL）を使用すれば、データベースのリテンションタイムを容易に再現することができます。化合物のリテンションタイムがユーザーの設定した許容範囲（通常は±10 秒）に収まらない場合は「ヒット」をはじくようになっており、この許容範囲を設定することも可能です。この機能により、偽陽性ヒットが大幅に減少します。

図 3 の「AMDIS/R.T. diff sec.」列は、クロマトグラムの化合物のリテンションタイムの値と、ポジティブリスト農薬ライブラリにあるリテンションタイムの値との差を示しています。DRS で同定した 156 種類の農薬のうち、データベース値と 2 秒以上のリテンションタイム差があったものは、10 種類未満でした。きわめて汚れたサンプルでは、ピークが若干変化することがありますが、リテンションタイム枠を広げれば、その変化に対応することが可能です。その場合でも、リテンションタイム条件により、ほぼすべての偽陽性ヒットが排除されます。

一般的に、60 を上回るマッチ率はきわめて信頼性が高いといえます。特に、NIST ライブラリとも良好にマッチしていれば、その信頼性は高くなります。図 3 に示している DRS レポートでは、最小マッチ値を 40 に設定しました。レポート上のいくつかの農薬では、AMIDS マッチファクタが 40～60 となっています。これらの農薬については、Qedit データを参照するといいでしょう。Qedit データには、ChemStation データと組み合わせた AMDIS データが含まれます（DRS バージョン A.04 以上を使用）。

確認ステップでは、NIST ライブラリ検索アルゴリズムを用いて、ヒットした各デコンボリューションスペクトルが全 NIST 質量スペクトルライブラリで検索されます。NIST ライブラリでヒットが見つかった場合、マッチ値とランクがレポートされます。Hit number:1 は、AMDIS で同定された化合物が NIST ライブラリでも良好にマッチしたことを示しています。

このメソッドの詳細については、以前のアジレントアプリケーションで解説しています [1]。DRS バージョン A.04 の利点については、最新の Agilent eSeparation Times 記事で紹介されています [2]。

まとめ

- このアプリケーションノートでは、厚生労働省がポジティブリスト制度で規制している GC 分析可能な農薬をスクリーニングするメソッドについて説明しています。
- 新しいポジティブリスト農薬データベースには、430 種類の農薬のマススペクトルと各農薬のリテンションタイムが含まれています。
- デコンボリューションを使用すれば、ライブラリ検索が可能なクリーンなスペクトルを未分離ピークから抽出できます。
- デコンボリューションレポート作成ソフトウェア（DRS）は、すべてのデコンボリューションされたスペクトルを日本ポジティブリスト農薬データベースと比較し、マッチスペクトルを見つけます。リテンションタイムの厳密な許容範囲に収まるものが「ヒット」とされます。これはリテンションタイムロッキングの使用により可能になります。
- スクリーニングに要する時間は 1 データファイルあたり 2～3 分で、信頼性も従来の GC/MS メソッドより高くなっています。
- DRS では、ChemStation、AMDIS、NIST のライブラリ検索により同定された化合物を示したサマリーレポートが作成されます。デコンボリューションされていないスペクトルとデコンボリューションされたスペクトルをもとに、較正している化合物を定量します。
- このメソッドでは、厚生労働省の規制対象である 430 種類の農薬すべてを、1 回の分析でスクリーニングすることができます。
- このメソッドの詳細は、参考文献 1 に記載されています。

参考文献

1. Philip L. Wylie, 「ポジティブリスト農薬メソッドを用いた食品中農薬のスクリーニング (Screening for Pesticides in Food Using the Japanese Positive List Pesticide Method: Benefits of Using GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a Retention Time Locked Mass Spectral Database)」 、資料番号 5989-7436JAJP
2. Mike Szelewski, "I'm interested in quantitation using deconvolved areas. Are the advantages of DRS Version A.04 great enough to justify learning this new software?" eSeparation Times, 21 (2), www.agilent.com/chem.

謝辞

農薬添加ピーマンエキスを提供してくださった米国農務省の Stephen Lehotay 博士と Katerina Mastovska 博士に謝意を表します。

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008
Printed in Japan
September 18, 2008
5989-9320JAJP